

ARCHIVIO

PER LE

SCIENZE MEDICHE

PUBBLICATO DA

G. BIZZOZERO (Torino) — C. BOZZOLO (Torino) — P. FOÀ (Torino)
C. GIACOMINI (Torino) — C. GOLGI (Pavia) — L. GRIFFINI (Genova)
N. MANFREDI (Pisa) — E. MARCHIAFAVA (Roma) — A. MOSSO (Torino)
L. PAGLIANI (Roma) — E. PERRONCITO (Torino) — E. SERTOLI (Milano)
C. TARUFFI (Bologna) — G. TIZZONI (Bologna)

E DIRETTO DA

G. BIZZOZERO

Estratto

TORINO E PALERMO
CARLO CLAUSEN

FIRENZE - ERMANNO LOESCHER - ROMA

1892

Laboratorio di Patologia Generale della R. Università di Pisa.

RICERCHE SULLA PATOGENESI ED ETIOLOGIA

DELL'

INFEZIONE VACCINICA E VAIOLOSA

DEL PROF.

Giuseppe GUARNIERI

(Tav. XII)

Se si consultano i manuali di patologia, di anatomia patologica ed i trattati di malattie cutanee anche più recenti, si nota come intorno alla etiologia delle infezioni vaccinica e vaiolosa si posseggano delle conoscenze assai scarse ed imperfette. Questa lacuna, che del resto esiste ancora per un numero cospicuo di malattie d'infezione, non è stata certo colmata dai lavori parassitologici che hanno avuto luce in questi ultimi tempi intorno a così importante argomento. Questi studi di fatto lungi dal semplificare il problema, per la varietà e disparità dei fatti posti in luce e delle induzioni sostenute, hanno contribuito solo a dimostrare l'esistenza di gravi difficoltà per la soluzione di esso. Del resto si comprende facilmente a priori, che, come in ogni altra malattia localizzata alla cute, nel vaiuolo e nel vaccino si hanno di fronte delle condizioni di ricerca difficili per le cause di errore così numerose e facili in lesioni anatomo-patologiche tanto esposte alla invasione dei microrganismi dell'ambiente.

La giustezza di questo asserto traspare in modo evidente dallo studio dei numerosi lavori che da tempo si vanno accumulando nella letteratura medica.

Per amore di brevità tralascio di riassumere quanto è stato pubblicato a questo riguardo, perchè mi è sembrato che tutte queste ricerche abbiano una importanza ed un interesse per la profilassi da una parte e per la patogenesi delle associazioni morbose dall'altra, piuttostochè per la questione della etiologia di questa infezione nel senso più stretto della parola. Questo enorme accumulo di lavoro difatto ha una importanza direi quasi preparatoria per lo studio etiologico dei processi morbosi in parola; e sotto questo punto di vista mi è stato certo di una grande utilità il poter consultare molte delle più interessanti memorie sull'argomento. L'esame critico di esse mi ha indirizzato alla ricerca etiologica per la via più diretta, risparmiandomi in parte la fatica di osservazioni ed esperienze infruttuose.

Ove si pensi alla esistenza del fatto, che non si trovano schizomiceti nel periodo prepustolare o nelle vescicole vacciniche e vaiolose molto giovani prima del processo suppurativo, come è noto nella scienza (Garre), e come ho potuto io stesso dimostrare ripetute volte, si è spinti alla ricerca parassitologica guidati da ben altre ipotesi che non sono quelle delle origini batteriche del virus vaccinico e vaioloso.

Nè mancano invero nella letteratura medica studi, che, diretti sotto questo punto di vista, abbiano aperta la via all'acquisto di nuovi fatti per porre le basi di una dottrina sulla infezione vaccinica e vaiolosa, che possa resistere agli attacchi di una sana critica.

Per primo, per quanto io mi sappia, il Renaut (1) nel suo lavoro sul meccanismo della pustolazione vaiolosa ha portata la sua attenzione sopra globuli sferici, brillanti, endo-cel-

(1) Renaut, « Nouvelles recherches anatomiques sur la prépustulation et la pustulation variolique » (*Annales de Dermatologie et de Syphilographie*, tome II, 1881).

lulari, che facilmente si coloravano con i comuni mezzi di colorazione. Egli pensò che tali globuletti fossero degli elementi parassitari, ai quali dovesse assegnarsi capitale importanza per la trasformazione cavitaria (Leloir) degli elementi epiteliali del corpo mucoso del Malpighi.

Il Van der Loeff (1) ricercando nella linfa vaccinica osservò dei corpi, molto rari nei preparati per schiacciamento fra due lastrine e più frequenti in quelli fatti in goccia pendente. Questi corpi erano dotati di movimenti proprii ed egli per questo li ritenne molto affini ai Rizopodi. Ricercando con gli stessi metodi semplicissimi nel pus di due vaiolosi, ritrovò corpi ameboidi molto simili a quelli trovati nella linfa vaccinica.

Quasi contemporaneamente L. Pfeiffer (2) descrisse un nuovo parassita che chiamò *monocistis epitelialis*. Lo vide nelle pustole cutanee di diversi mammiferi ed in quelle vaiolose e vacciniche dell'uomo come anche nelle vescicole dell'*herpes zoster*. Ritenne che questo microrganismo passasse i suoi primi stadi di sviluppo nel protoplasma degli epitelî cutanei, i quali per l'accrescersi del parassita venivano distrutti. Si ritrova poi dentro il protoplasma dei leucociti. Presentava una forma rotonda od ovale ed aveva una macchia chiara nucleare. Più tardi, rivestito da una membrana capsulare liscia, compieva le fasi della sporulazione.

Corredò il suo lavoro di due tavole, che certo hanno assai poco contribuito ad illustrare le sue descrizioni.

Questi lavori racchiudono indubbiamente, sebbene si sia ad essi posta finora pochissima attenzione, dei fatti, che hanno

(1) Dr. A. van der Loeff, « Über Proteiden in dem animalischen Impfungsstoffe » (*Monatshefte für Praktische Dermatologie*, B. VI, N. 5, 1 März 1887).

— « Über Proteiden oder Amöben bei Variola vera » (Id., B. VI, N. 10, 15 Mai 1887).

(2) L. Pfeiffer, « Ein neuer Parasit des Pockenprozesses aus der Gattung Sporozoa (Leukart) » (*Monatshefte f. Praktische Dermatologie*, B. VI, N. 10-15, Mai 1887).

— « Die Protozoen als Krankheitserreger », Jena, 1890.

per se stessi un altissimo interesse scientifico. L'insufficiente studio, le descrizioni o imperfette o fatte solo incidentalmente in ricerche di altro ordine hanno contribuito potentemente a lasciare dubbioso l'animo dei clinici e dei patologi su di essi, tanto che, il più delle volte, non sono stati ricordati nei manuali, o, se pur ve ne è fatta menzione, non si è accordata ad essi l'importanza che hanno di fatto.

Del merito però di queste osservazioni mi sono intimamente convinto, quando ad esse ho potuto paragonare i risultati delle mie ricerche che da tempo ho intraprese e che espongo in questo lavoro.

Ho incominciato con lo studio delle alterazioni vaiolose della cute e delle mucose nell'uomo. Malauguratamente il materiale, che ho adoperato per tale studio, è stato sempre ritratto da cadaveri necessariamente dopo molte ore dalla morte. Per tale ragione nel porre in rilievo i fatti, che emergono da queste osservazioni, ho incontrate delle gravi difficoltà per le alterazioni cadaveriche più o meno avanzate, che sempre influiscono a modificare l'aspetto istopatologico del processo.

Nel riassumere la descrizione delle lesioni anatomiche della cute e delle mucose in tali condizioni di ricerca, lungi dal fare una descrizione completa della genesi della pustolazione vaiolosa così dettagliatamente nota nella scienza (Weigert-Renaut), terrò solo conto di quei fatti che più d'avvicino riguardano la mia tesi.

Le lesioni patologiche s'iniziano nel corpo mucoso del Malpighi, come è noto, a piccoli focolai che ingrandiscono progressivamente espandendosi in tutti i sensi. Le regioni colte dall'alterazione mostransi già a piccolo ingrandimento meno capaci di assorbire le materie coloranti e per questa ragione più facilmente si possono ritrovare con le lenti ricercatrici. I nuclei sono più lontani gli uni dagli altri, vescicolari e nettamente visibili, perchè il più delle volte sono contenuti in un campo chiaro. Evidentemente gli epiteli in questi punti sono aumentati di volume e contribuiscono così, sollevando gli strati cellulari più periferici, alla formazione della papula.

Ove si esaminino queste regioni con più forte ingrandimento (Fig. 1^a) si nota come le alterazioni hanno colpito più particolarmente il protoplasma cellulare risparmiando a questo momento i nuclei che non presentano lesioni apprezzabili. Già nelle parti più periferiche degli elementi cellulari non si riesce più a vedere le dentellature di Schultze ed una sostanza quasi lamellare a più strati considerevolmente spessa occupa il posto di essa ed incornicia più o meno completamente ogni nucleo cellulare. Probabilmente questa alterazione ha sede nella porzione periferica del protoplasma degli epitelî, fondendo insieme le parti in contatto, per cui non si distingue più il limite fra un elemento e l'altro. Nella porzione del protoplasma più vicina al nucleo vi sono come escavati degli spazi chiari, i quali a volta raggiungono la grandezza di quasi due terzi della cellula. In questi vacui completamente trasparenti o ripieni di un detritus finamente granuloso è contenuto il nucleo, il quale viene ordinariamente respinto da un lato. Oltre il nucleo vi si rinvencono costantemente dei corpicciuoli che si colorano intensamente con il carminio boracico, con l'ematosilina, con la safranina, con il rosso di Magenta, ecc. Essi hanno forma varia con sporgenze irregolari arrotondate. Hanno un volume assai vario. A volte raggiungono quasi la grandezza della metà di un nucleo epiteliale, altre volte sono piccolissimi e paragonabili ad un micrococco. Parrebbe che le forme più voluminose tenessero il centro del focolaio patologico e le forme più piccole occupassero gli elementi cellulari più periferici della zona alterata. Questo fatto farebbe pensare che tali corpicciuoli aumentassero di volume con il progredire dell'alterazione del corpo mucoso. E tanto più appare probabile questa ipotesi, in quanto si può fino ad un certo punto riconoscere, che il volume loro è anche in rapporto diretto con il grado dell'alterazione cavitaria dell'elemento cellulare.

Questi corpicciuoli poi in queste specie di nicchie sono d'ordinario solitari, ma a volte vi si ritrovano in numero di due e più raramente di tre. Sono collocati nella maggior parte

dei casi a certa distanza dal nucleo, assai raramente però sono ad esso aderenti; ed allora si adattano deformandosi alla superficie della membrana nucleare. Per questa ragione appare evidente che tali corpi devono essere molli, plasmabili, poichè attaccandosi essi alla superficie del nucleo, questo conserva d'ordinario la sua forma vescicolare. Assai raramente mi è occorso di vedere questi corpicciuoli innicchiati nel nucleo, i quali allora presentano la membrana infossata per dar posto alla piccola massa, che resta però costantemente esterna alla cavità nucleare. Non sono riuscito con i migliori mezzi di tecnica e con le migliori lenti di riconoscere la struttura intima di questo corpicciuolo: esso si mostra composto di una sostanza omogenea che si tinge uniformemente tanto al centro che alla periferia.

Fra gli altri fatti degni di altissimo interesse che accompagnano questo periodo iniziale, prepustolare delle lesioni vaiolose, va segnalata anche l'attivissima proliferazione delle cellule epiteliali e nel focolaio delle lesioni e nelle adiacenze di esso. Ad onta delle condizioni sfavorevoli del mio materiale di studio per una ricerca così delicata si arriva con sufficiente evidenza alla dimostrazione di questo fenomeno.

Attorno al punto della lesione si osservano costantemente mitosi in tutti gli stadi, specie nelle regioni profonde del corpo mucoso, le quali indubbiamente debbono essere di fatto assai più numerose di quello che appare nei miei preparati, come farebbe pensare la imperfezione delle immagini cariocinetiche ottenute. Questa moltiplicazione cellulare si effettua anche con molta attività nei centri delle lesioni come viene dimostrato dalla presenza in essi di cellule provviste di due nuclei. Talvolta poi ne contengono un numero assai maggiore; se ne possono contare fin dieci in un medesimo protoplasma. Allora essi sono ovalari, alquanto più piccoli, raggruppati in un canto della cellula e tutti orientati con il maggior diametro nello stesso senso. A volta in essi si nota un vistoso filamento cromatico, tal altra nucleoli molto appariscenti, ma d'ordinario sono cistici, pochissimo colorabili. Il protoplasma

di questi elementi non sembra aumentato in proporzione con il numero dei nuclei in esso contenuti. Esso assume forma irregolarissima, adattato a tutte le anfrattuosità lasciate dalle cellule epiteliali adiacenti, come si può benissimo osservare nelle sezioni disposte in serie. In esso si ritrovano egualmente le lesioni cavitare, e vi esistono costantemente i corpicciuoli sopradescritti. In questa specie di elementi epiteliali giganteschi essi sono sempre soli e collocati al polo opposto del gruppo dei nuclei.

Nella successiva evoluzione delle alterazioni epiteliali, nella formazione cioè della pustola, riesce sommamente difficile di seguire il destino dei corpicciuoli, i quali, perchè nei preparati miei non presentano caratteristiche note morfologiche, nè possiedono una colorazione specifica, si perdono di vista facilmente in mezzo al detritus epiteliale ed in mezzo all'accumulo di leucociti migrati. Di fatto è noto come le alterazioni degli elementi del corpo mucoso di Malpighi aumentino progressivamente, i nuclei si spezzettino, e degli epiteli non restino che dei setti formanti cavità alveolari, naturalmente derivate dalla fusione di più cellule rigonfie. Allora una notevole migrazione di leucociti invade questi alveoli, e si uniscono in mezzo al liquido siero-fibrinoso ai resti nucleari ed ai noti corpicciuoli.

Mentre questo accade nelle parti centrali della pustola, le regioni più periferiche presentano degli elementi epiteliali, nei quali si riconoscono le lesioni caratteristiche del periodo prepustolare.

Mentre poi le cellule epiteliali superficiali, quelle immediatamente al disotto dello strato lucido sono rigonfie, e comprimendosi le une con le altre assumono l'aspetto di cellule vegetali, dentro le quali a volte si vede il corpicciuolo nettamente distinto dal nucleo.

È notevole poi un altro fatto che intanto colpisce l'attenzione, ed è la presenza nelle nominate cavità alveoliformi di globetti molto simili a cocci, il più delle volte separati gli uni dagli altri, altre volte aggruppati insieme in contatto in-

timo in modo da formare un piccolo corpo moriforme. Si ritrovano assai facilmente in mezzo al siero coagulato dai reagenti adoperati per la fissazione e l'induramento, quando una cospicua migrazione cellulare non mascheri il campo d'osservazione. Questi globetti hanno grandezza varia che oscilla nel diametro da 1 a 3 μ . Si colorano intensamente con le comuni sostanze coloranti. Con doppia colorazione fatta con soluzione acquosa alcalina di turchino di metilene e soluzione acquosa semplice di Safranina O si vede nettamente che questi globetti constano di due sostanze: una esterna che assume il colore turchino, ed una centrale che prende il colore rosa. La parte esterna involge l'altra a guisa di sottile membranella, che in sezione ottica appare come un netto cerchietto che circonda la sostanza interna di aspetto omogeneo, nella quale non si rivela alcuna struttura.

Presenta eziandio molto interesse lo studio delle alterazioni che si rinvencono nelle mucose. Ho potuto esaminare quelle della laringe e della faringe in tre cadaveri. Le preparazioni dimostrano costantemente una neoformazione attivissima delle cellule epiteliali a focolaio, per cui in tali zone si possono contare, come già altri hanno osservato (Cornil e Ranvier), perfino 8 o 10 strati epiteliali. Nei limiti, dove il processo di proliferazione è iniziale, si nota un numero straordinario di mitosi meravigliosamente evidenti per preparati fatti dalla mucosa di cadaveri sezionati dopo molte ore dalla morte. Anche in questo caso, sebbene con minore evidenza che nelle lesioni cutanee, nel protoplasma degli epiteli si rinvencono i noti corpicciuoli. In alcuni punti questi si vedono nettamente situati in nicchie scavate nel protoplasma delle cellule epiteliali. Anche qui è inutile insistere sulla ricerca della struttura intima di questi corpicciuoli, poichè, come mi sono persuaso, le alterazioni cadaveriche li rovinano rapidamente. È molto difficile inoltre di rintracciarli nei punti dove il processo di alterazione del tessuto è molto avanzato, dove il protoplasma delle cellule è rigonfio, i nuclei o spezzettati o deformati o ripieni di goccioline di sostanze molto avide di colore,

e dove esistono delle zone di necrosi ricoperte da pseudomembrane piene di schizomiceti, limitate da infiltrazioni cellulari.

Feci eziandio alcuni esami sul contenuto delle pustole o disseccato sulla superficie di vetrini, od in gocce pendenti, mescolando il materiale con soluzione di turchino di metilene in siero di sangue umano, o senza alcun artificio di colorazione. Malauguratamente non mi è riuscito di poter eseguire queste osservazioni in condizioni adatte, nè in numero sufficiente, per cui dell'accertamento di molti fatti mi restano ancora dei dubbi e mi riservo di parlarne in ulteriore lavoro.

Tutti questi fatti del resto messi in rilievo dall'esame microscopico delle alterazioni vaiolose nell'uomo presi da soli mi sono apparsi insufficienti per poterne trarre una conclusione. Per apportar luce alla interpretazione di fenomeni così speciali e così costanti, mi è sembrato opportuno di ricorrere al sussidio dell'analogia, studiando un'altra infezione molto simile al vaiolo umano nelle manifestazioni morbose. L'infezione vaccinica difatto presentava sotto questo punto di vista molti vantaggi.

Con linfa vaccinica avuta direttamente dall'Istituto vaccinogeno dello Stato e da altri istituti nazionali ed esteri, inoculai a più riprese delle pecore e delle coniglie nelle mammelle, e dei conigli nella mucosa delle labbra. Ottenni quasi costantemente, avendo cura nel fare l'innesto di seguire le regole dell'antisepsi e di fare le minori lesioni cutanee possibili, bellissime pustoline che potetti escidere a diversi stadi di sviluppo. I pezzi fissati in soluzione di sublimato corrosivo (1) venivano conservati in alcool.

(1) I pezzi venivano tenuti per 20 o 30 minuti, a seconda del loro volume, in una soluzione di sublimato corrosivo della formula seguente:

Acqua distillata	gram. 100
Cloruro di sodio	» 3
Sublimato corrosivo	» 20
Acido acetico	» 3.

Passati nella serie degli alcool con qualche goccia di tintura alcoolica di iodio, venivano conservati nell'alcool a 90°. Ho ottenuto così, anche per altre ricerche, delle ottime fissazioni che si colorano assai bene con la ematossilina, carminio, ecc.

Le sottili sezioni di esse anche dopo 36 ore dall'innesto dimostrano costantemente sul punto d'inoculazione un focolaio d'infiltrazione cellulare, che invade l'epitelio fin verso la superficie e che si estende e cresce progressivamente negli stadi più avanzati di pustolazione. È questo certo un grave inconveniente, che con le inoculazioni nella cute e nelle mucose per la produzione sperimentale delle pustole non si riesce in nessun modo ad evitare. Ciò non di meno però le lesioni epiteliali primitive possono essere molto comodamente studiate nelle zone adiacenti immediatamente al posto della infissione o scarificazione fatta con la lancetta d'innesto. Quivi si vedono assai sovente delle cellule epiteliali, che senza alcuna alterazione del nucleo, solo presentano una nicchia nel protoplasma, dentro la quale esiste un corpicciuolo assai simile a quello anzi descritto nelle alterazioni vaiolose umane. Nelle preparazioni bene riuscite si nota come esso consti di una sostanza esterna di forma varia, di struttura omogenea, che contiene nella parte centrale un evidente nucleo o rotondo od ovalare più intensamente colorato del protoplasma che lo involge.

Queste apparenze, lungi dal far giudicare tale corpicciuolo per un paranucleo d'origine patologica (Nussbaum-Platner) destano nella mente l'ipotesi che esso possa essere un parassita vivente e per la sua intima struttura e per i rapporti con il protoplasma cellulare.

Per tal ragione ho fatti molti tentativi di cultura, che, essendo riesciti infruttuosi, per amore di brevità non istarò ad enumerare. Solo ricorderò le culture fatte sopra lembetti di epitelio che, tolti dall'uomo o dalle mammelle di coniglie, con le più scrupolose cautele antisettiche, e posti in capsule con siero sterilizzato e disseminate di detrito di vaccino, o sospesi in tali condizioni in goccia pendente, mi dettero pur essi costantemente risultati negativi.

Il siero ed il brodo, per quante precauzioni si usassero, erano invasi rapidamente da batterii, ed intanto nelle preparazioni dei lembetti di epitelio non si presentavano alterazioni che per nulla potessero essere paragonate a quanto ho già de-

scritto nei preparati delle pustole sperimentali della pecora e del coniglio.

Pensai allora di studiare la questione su superficie epiteliali viventi. Scelsi per questo la cornea del coniglio, che possiede già una sufficiente recettività per l'infezione vaccinica, come quella che più di ogni altra superficie epiteliale permetteva l'osservazione e la sorveglianza diretta dei fenomeni.

Con un piccolo ago lanceolato molto tagliente e sterilizzato in acqua bollente praticava nelle parti centrali della cornea il più superficialmente possibile, tenendo il piano della lancetta tangente alla curva corneale, una puntura in modo da sollevare un piccolissimo lembo di epitelio. Nella specie di tasca così fatta introduceva nuovamente l'ago dopo averlo bagnato nel pus vaccinico.

Dopo 8 o 10 ore si riconosce con grande difficoltà il punto d'innesto nella superficie corneale, che appare perfettamente trasparente. Dopo 24-30 ore si nota, dove fu fatta la lesione di continuo con l'ago, un ispessimento dello strato epiteliale, che appare alquanto sollevato dalla linea di curvatura normale della cornea medesima. Quest'ispessimento si estende attorno al punto d'innesto ora circolarmente, ora in una maniera più o men irregolare per due o tre millimetri al più. Dopo 40-50 ore i fatti summentovati si accentuano senza che si vegga sul posto, ove l'innesto sia stato fatto con tutti i rigori di tecnica, alcuna macchia opaca. L'ispessimento epiteliale dopo 60-70 ore cresce e la prominenza diventa sempre più evidente, specie se si guarda la cornea nel suo profilo. Intanto a qualche distanza dal punto d'innesto si notano spesso disseminate in modo irregolare delle piccole elevazioni epiteliali trasparentissime. Questa eruzione di puntolini miliarici passerebbe inosservata se non vi si prestasse molta attenzione, e non si adoperasse per rischiarare la cornea un fascio di luce artificiale.

Già a questo momento sul posto dove fu praticato l'innesto si va accrescendo la lesione di continuo e si forma come una

piccola ulcerazione irregolare a bordi frastagliati; la cornea a questo punto si opaca. Più tardi la cavità ulcerosa interessa a tutto spessore lo strato epiteliale, e a volte si estende anche agli strati lamellari della cornea stessa. Allora nella parte più profonda dell'ulcera si notano dei lembetti necrotici, ed attorno si forma un alone opaco più o meno esteso, e talvolta anche ipopion. Ordinariamente però la necrosi si limita e si ha una riparazione del processo con un leucoma centrale.

In diversi stadi di sviluppo delle alterazioni sovradescritte feci degli esami microscopici su brandelli di epitelio presi con il raschiamento superficiale della cornea. Le dissociazioni venivano fatte su vetrini coprogetti in mezzo ad una o due gocce di lagrime raccolte nella tasca palpebrale inferiore col mezzo di un tubetto capillare. La preparazione veniva collocata capovolgendola sopra di un porta-oggetti incavato e circondato da uno strato di vasellina che faceva così aderire completamente la superficie delle lastre in contatto.

L'epitelio si presenta granuloso ed opaco nella massima parte dei casi, tanto che riesce assai difficile di poter in esso distinguere il nucleo. Alcune volte però la intima struttura dell'elemento epiteliale appare con sufficiente chiarezza, ed è appunto nei casi, nei quali esso è più o meno alterato. In tali cellule epiteliali il nucleo ordinariamente è spinto da un lato, mentre dall'altra parte del protoplasma esiste un corpicciuolo splendente, che può essere paragonato ad un pezzettino di ambra della quale ha il colore e la rifrangenza, che spicca su quello del protoplasma cellulare di color biancastro sporco. Se il preparato viene tenuto alla temperatura pressappoco di 38°-40°.c. con il tavolino riscaldante di Reichert, si nota come esso sia *capace di cangiar forma*. I movimenti ameboidi, osservati in questo corpicciuolo in tali condizioni, sono molto lenti, assai più lenti di quelli che si osservano nelle amebe malariche dentro i globuli rossi dell'uomo. Debbo far notare che l'osservazione di questo fenomeno presenta delle grandi difficoltà, perchè il protoplasma epiteliale anche nei casi più favorevoli è sempre torbido, ben diverso dal proto-

plasma omogeneo dei globuli rossi dove la retina dell'osservatore con i mezzi ottici attuali può apprezzare facilmente le più lievi variazioni di forma.

Ove si faccia penetrare al disotto della lastrina qualche goccia di lagrime, nelle quali sia stato sciolto del turchino di metilene, il corpicciuolo suddescritto si colora intensamente assumendo una forma rotondeggiante; ma la struttura di esso si studia assai più vantaggiosamente nelle cornee fissate nella soluzione di sublimato corrosivo acidulata con acido acetico, e sezionate in serie.

Esaminando a piccolo ingrandimento questi preparati si nota, nei casi ove l'ago lanceolato ha sollevato solo degli straterelli epiteliali, che il tessuto lamellare della cornea e lo strato di Bowman non presentano alcuna alterazione apprezzabile.

Gli strati epiteliali di rivestimento sono aumentati in numero, specie nelle adiacenze della infissione. Quest'ispessimento è irregolare e presenta assai sovente delle elevazioni a guisa di piccole papille disseminate variamente senza una legge di distribuzione. Nella parte centrale di esso si osservano delle lesioni di continuo che corrispondono indubbiamente a quelle fatte dall'ago d'innesto: esse sono irregolari, frastagliate, con lembi epiteliali distaccati dalla lamina corneale anteriore, che a volta sono accartocciati in varia guisa. In alcune serie di preparati si nota, quando la lancetta sia penetrata fra le lamelle della cornea, che l'epitelio proliferante ha invaso il tramite lasciato dall'ago, e si vedono nelle sezioni come degli isolotti di cellule epiteliali contenuti nel tessuto proprio della cornea. L'epitelio intanto reagisce normalmente con le sostanze coloranti nei punti lontani dalle soluzioni di continuo, mentre invece nei lembetti distaccati esso si colora assai meno.

Ove i preparati vengano esaminati a più forte ingrandimento di quattro o cinquecento diametri (Fig. 3), si nota, come nelle adiacenze della lesione di continuo, nei lembetti epiteliali, negli isolotti di epitelio neoformato quasi ogni elemento cellulare contenga, oltre il nucleo, dei corpicciuoli molto colorati. Essi appaiono come incorniciati da uno spazietto chiaro

scavato nel protoplasma colorato della cellula, ed hanno dimensioni piccolissime nelle cellule più eccentriche dal punto di lesione, e raggiungono invece il loro massimo volume, paragonabile ad un terzo ed anche alla metà dei nuclei epiteliali, negli elementi dei margini della ulcerazione, dove il processo patologico è più adulto.

Mi sembra evidente per questa legge di distribuzione che la variazione di dimensione volumetrica di questi corpicciuoli rappresenti stadi diversi del loro sviluppo.

Se essi si esaminano con lente ad immersione omogenea (Fig. 4) si nota che sono provvisti di un evidente nucleo, il quale si colora intensamente con le comuni soluzioni coloranti. Esso ordinariamente è rotondo od ovalare; il protoplasma che lo avvolge ha forma assai svariata, talvolta è rotonda, tal altra ovoidea, ma il più sovente ha il contorno ondulato in varia guisa; una vera e propria forma ameboide.

In loro si rinvencono spesso uno o più *vacuetti* (Fig. 5, b), che appaiono come bollicine perfettamente chiare in mezzo al protoplasma colorato.

Un altro fenomeno intanto si rileva dalla osservazione delle sezioni così preparate, ed è il processo di moltiplicazione di questo corpicciuolo, che va considerato anche per tal ragione come un essere vivente. In primo luogo la moltiplicazione avviene *indubbiamente per scissione* (Fig. 7) e parrebbe che gl'individui, nei quali essa è per determinarsi, fossero quelli di forma ovalare con il limite del protoplasma nettamente e regolarmente disegnato. Difatti in essi anche il nucleo è ovoideo e spesso mostra già ai due poli due punti più intensamente colorati. Alcune volte il nucleo è diviso in due porzioni allontanate l'una dall'altra verso l'estremità opposte del protoplasma, ma sono ancora in rapporto fra di loro per delle sottili strie di sostanza filiforme. Quest'aspetto che ricorda con sufficiente somiglianza una figura di cariocinesi (*diaster*, *dispirema*) e che ha attirata vivamente la mia attenzione, ho solo potuto vedere tre volte in un numero assai considerevole di osservazioni. Più frequentemente però s'incontrano indi-

vidui con due nuclei allontanati fra di loro e completamente liberi. In alcuni di questi non si osserva alcun accenno di divisione nel protoplasma; mentre in altri invece sulla parte mediana del corpo cellulare si osserva una linea trasversale che disegna più o meno nettamente il limite di scissione fra i due elementi figli. Questa linea in altri ancora diventa un vero spazio intercellulare e gli elementi figli liberi staccandosi gli uni dagli altri assumono forme ameboidi nettissime. La serie di questi fenomeni si può osservare a volte in un medesimo preparato, ed indiscutibilmente vanno interpretati per diverse fasi di moltiplicazione cellulare per scissione semplice. E tanto più appare evidente questo modo di vedere, in quanto gli elementi figli costantemente sono molto più piccoli: rappresentano appena la metà del volume delle forme adulte, e l'eguagliano completamente quando sono disposti a coppia.

Parrebbe inoltre che esistesse un altro modo di moltiplicazione di questi esseri per *gimnospore* (Fig. 6). Nelle cornee tolte dopo tre o quattro giorni dall'innesto si trovano spesso nelle vicinanze della lesione di continuo, oltre ad elementi, nei quali si rinviene il nucleo o rotondo od ovalare, altri, nei quali assume una forma irregolare. In alcuni di essi si vede nettamente la figura di piccola stella o di raggiera, ed allora il contorno del protoplasma apparisce come dentellato con rilevature tondeggianti disposte regolarmente in giro.

In alcuni di essi si vede che i raggi del nucleo ad astro si spingono verso le parti più periferiche del corpo cellulare, che allora assume l'aspetto quasi della sezione trasversa di un arancio mondato. Sembrerebbe, facendo durante l'osservazione microscopica degli adatti movimenti della vite micrometrica, che tale aspetto fosse dato da *spore* ovoidali poco colorabili nella parte centrale disposte in giro tangenti fra di loro per il minor diametro, come i petali d'una margherita. Altre volte queste spore sono aggruppate fra di loro in una maniera meno regolare formando specie di corpi moriformi. Questi corpi così in segmentazione non sono racchiusi dentro una membrana cistica speciale, ma la loro superficie è libera dentro la caratteristica nicchia scavata nel protoplasma cellulare.

Sebbene le osservazioni si sieno ripetute sopra un numero considerevole di preparati, pure per la piccolezza delle immagini, e forse anche per i metodi poco adatti, dovendo adoperare i più forti ingrandimenti, non sono riuscito a vedere queste forme con la nettezza e precisione necessarie, e sono costretto per tal ragione a fare molte riserve per la interpretazione di esse come vere e proprie sporulazioni. Tanto più poi mi restano dei dubbi, perchè non sono riuscito in alcuna maniera a prepararle a fresco con o senza artificio di colorazione: mentre si sa che in questo modo per altri esseri molto affini si ottengono delle immagini molto chiare. Di fatto, servendosi di questi mezzi semplicissimi, si possono studiare molto comodamente le fasi di sporulazione del plasmodio della malaria, per poi ritrovarle e riconoscerle per tali nei capillari cerebrali, retinici e della milza, dove le immagini dopo l'azione dei mezzi fissatori sono assai meno nette.

Sebbene la disposizione dei segmenti a margherita in tali corpicciuoli sia tracciata con certa regolarità, direi quasi geometrica, pure potrebbe tale aspetto rappresentare una disgregazione necrobiotica, più che una vera segmentazione riproduttiva, tanto più che essa si ritrova specialmente dove il disfacimento del protoplasma degli epitelii è più avanzato. Con questo però non è detto che appunto, dove l'epitelio è più profondamente alterato si possano determinare le condizioni, adatte per una seconda maniera di riproduzione di questo essere per vera e propria sporulazione. Ma di questo in un successivo lavoro.

Le alterazioni epiteliali intanto che sono in diretto rapporto con la vita del parassita, presentano molto interesse per la interpretazione della evoluzione del processo patologico. Esse cominciano con la penetrazione, dentro il protoplasma, del parassita, il quale si scava una specie di nicchia, che ha forma d'ordinario sferoidale, come si vede chiaramente in quelle cellule, dove si può sorprendere il fenomeno negli stadi non molto avanzati (V. fig. 5, *a*). L'escavazione ha una capacità assai maggiore del volume del microrganismo, ma è sempre

proporzionata alla grandezza di esso. La zona compresa fra la superficie della cavità e quella del microrganismo è incolore e perfettamente trasparente.

È logico credere che questo essere parassitario nel muoversi dentro a questa cavità corroda la parete distaccandone delle particelle per servire alla propria nutrizione. E la funzione nutritiva, che in esso si compie alla maniera istessa che avviene per altri esseri amebiformi, è quella che sovra ogni altra proprietà deve influire sulla evoluzione delle alterazioni istologiche. Difatti negli stadi più avanzati del processo questa specie di nicchia scavata nel protoplasma s'ingrandisce, perde la sua forma sferoidale, ed occupa a volta quasi tutto il protoplasma. Le cellule epiteliali, così profondamente lese, nei punti di alterazione più avanzata cadono distaccate in gruppi dalla superficie, o sono invase da leucociti migrati: altre volte invece gli epitelii così escavati vengono sostituiti da altre cellule epiteliali di neoformazione che respingono da un lato il nucleo superstite ed in parte si ricingono schiacciandolo con i resti del protoplasma (V. fig. 2). Poichè, come già abbiamo visto, una rigogliosa proliferazione delle cellule epiteliali accompagna costantemente l'accrescersi ed il moltiplicarsi dei parassiti che invadono a volta il protoplasma pur anco dei giovani epitelii, nei quali i nuclei sono ancora in fase di dispirema. Questa caratteristica iperplasia epiteliale delle manifestazioni anatomiche dell'infezione vaccinica trova molta analogia non solo con quanto avviene in altri morbi nei quali la proliferazione epiteliale è notoriamente rilegata al parasitismo di un protozoo, per es: l'epitelioma contagioso dei colombi (Rivolta-Böllinger), ma anche, e questo ha un interesse diretto per noi, con la neoproduzione epiteliale attivissima nelle manifestazioni anatomiche dell'infezione vaiolosa nell'uomo.

Ho richiamata dianzi l'attenzione su questo fatto, del resto noto nella scienza; ora aggiungo che di esso ho ottenuta la riprova sperimentale, inoculando nella cornea linfa raccolta da vescicole vaiolose. Con questo mezzo non solo si provoca

la iperplasia degli epiteli corneali, ma eziandio molti altri fenomeni che servono a dimostrare la stretta parentela dell'infezione vaccinica con quella vaiolosa.

Potetti avere della linfa raccolta da pustole vaiolose dall'ospedale delle malattie d'infezioni di Milano, dal lazzaretto di Cecina e da quello di Pisa. Molti degl'innesti fatti dettero rapidi flemmoni corneali in taluni casi con ipopion successivo, alla stessa maniera che avveniva nelle prove di controllo con pus da piogeni comuni. In altri non si ebbero alterazioni apprezzabili, come si osserva costantemente nelle semplici lesioni traumatiche asettiche. In altri invece si osservarono fenomeni molto simili a quelli dianzi descritti per le inoculazioni di linfa vaccinica: solo la proliferazione epiteliale si faceva più rapida, ed il processo riparatore delle lesioni di continuo era più pronto.

Le preparazioni poste in serie dimostrano a piccolo ingrandimento, oltre l'iperplasia dell'epitelio nelle adiacenze dell'innesto, anche la presenza di corpicciuoli nel protoplasma di alcune cellule (V. fig. 2). Essi sono contenuti pure in nicchie di capacità assai maggiore del loro volume, cosicchè appaiono come circondate da una zona chiara; posseggono un evidente nucleo che si colora molto più intensamente del protoplasma che lo circonda. Studiando parecchi preparati si possono sorprendere le diverse fasi di una moltiplicazione per scissione, che avviene alla stessa maniera di quella che si osserva nei corpicciuoli dell'infezione vaccinica.

Per quante prove io abbia fatte non sono riuscito ad osservare direttamente i movimenti ameboidi di questo essere, come invece potetti vedere in quello del vaccino. È molto probabile però che anche questo microrganismo possegga dei movimenti proprii, poichè esso, nei preparati fissati col sublimato, non solo ha forma ovoidea o rotondeggiante, ma anche mostra a volta il suo protoplasma ondulato in varia guisa, come vengono sorpresi spesso da reagenti fissatori molto attivi altri elementi amebiformi. D'altra parte poi si comprende facilmente come sia assai più difficile l'incontrarsi nell'osservazione

microscopica con elementi cellulari che permettano l'esame diretto di tali movimenti, giacchè in queste prove sperimentali d'innesto sulla cornea del coniglio esiste un numero assai minore di elementi cellulari invasi dal parassita. Di fatto nei miei preparati meglio riusciti si vedono in mezzo alla grande iperplasia epiteliale solo qua e là nei margini della lesione dei gruppetti limitati di cellule, che contengono il parassita, mentre la maggioranza degli epiteli ne è assolutamente sprovvista.

L'insieme di questi fatti mi sono apparsi sufficienti per autorizzare alla interpretazione dei fenomeni osservati nelle lesioni vaiolose della cute umana: giacchè il corpicciuolo provvisto di nucleo e protoplasma che, per le sue proprietà d'escavare gli epiteli corneali, siamo spinti a ritenere per un parassita vivente, è l'equivalente del corpicciuolo che si rinviene costantemente nel periodo prepustolare delle lesioni vaiolose umane.

Sebbene queste mie ricerche presentino una quantità di lacune da colmare, pur non di meno per esse viene accertata l'esistenza di alcuni fatti che aprono la via a nuove dottrine intorno alla patogenesi ed alla etiologia di morbi, che hanno un così alto interesse nella scienza. Confortato da questo pensiero mi sono deciso di pubblicare questa mia prima nota nella speranza di poter meglio contribuire alla questione in seguito, quando avrò completato altri studi che sono già avviati.

È indubitato intanto che l'infezione vaccinica ha per fatto anatomico costante la formazione di pustole, che segue ad una alterazione caratteristica dell'epitelio del corpo mucoso malpighiano. Queste alterazioni coincidono con la vita endocellulare di un essere amebiforme, il quale possiede un evidente nucleo, un protoplasma dotato di movimenti proprii ed è capace di accrescersi e di moltiplicarsi. La moltiplicazione di esso si fa, durante la evoluzione dell'alterazione patologica, *senza dubbio* per scissione, che s'inizia con un processo di cinesi della sostanza nucleare, e *probabilmente* anche per endogenesi di gimnospore. Per tali proprietà morfologiche non

cade dubbio che questo essere monocellulare debba considerarsi come un Protozoo parassita, probabilmente della classe degli Sporozoi (Leuckart).

Frattanto nell'attendere che ulteriori studi illustrino meglio la morfologia e la biologia di questo microrganismo, mi è parso opportuno di chiamarlo col nome di *Citoryctes*, desumendolo dalle sue caratteristiche proprietà patologiche di corrodere il protoplasma cellulare nel quale esso compie il suo ciclo vitale. Questo nome, sebbene informato solo al concetto dell'importanza del parassita nella genesi delle lesioni, mi fa ritenere, che, mentre da un lato esso rende una esatta idea delle sue proprietà patogene, debba dall'altra non essere improprio nel designare la sua importanza zoologica. Del resto esso stabilisce un genere nel quale dovranno indubbiamente raggrupparsi nuove specie di esseri molto affini fra di loro. Difatto, come la patologia e l'igiene insegnano, esiste fra la patogenesi dell'infezione vaccinica e di quella vaiolosa una certissima analogia, che le mie ricerche dianzi esposte hanno confermato pienamente. Per i risultati di esse appare evidente, che anche nell'infezione vaiolosa, a simiglianza di quella vaccinica, esiste un *Citoryctes*, il quale compie il suo ciclo vitale in rapporto diretto con l'evoluzione del processo patologico. Sebbene in condizioni di ricerca poco favorevoli, ho potuto determinare con sufficiente dettaglio e precisione le proprietà biologiche e morfologiche del *Citoryctes variolae* che mostra una evidente somiglianza con il *Citoryctes vaccinae*. Ma esistono indubbiamente fra i due microrganismi note differenziali *specifiche* che meritano di essere studiate, come per esempio la preferenza di sede nella vita parassitaria spontanea in una specie di animali piuttosto che in un'altra. Mentre si prevedono così l'esistenza di caratteri speciali suggeriti anche dalle differenze di entità ed estensione morbosa, la simiglianza delle proprietà patogene che rispettivamente possiede ciascuno di questi Protozoi parassiti, serve a ravvicinarli fra di loro. La base di fatto delle lesioni anatomiche, tanto nel vaccino che nel vaiuolo, è l'alterazione caratteristica degli epiteli del

corpo mucoso Malpighiano, rispettivamente di quello della faringe, della cornea, ecc., che si rivela con la distruzione cavitaria del protoplasma cellulare dovuta all'azione corrosiva dei parassiti in esso annidati, i quali tanto nell'un caso che nell'altro agiscono in una maniera assai analoga.

Resta in tal maniera spiegato il meccanismo di formazione dell'alterazione prepustolare, e facilmente si comprendono poi le alterazioni successive, che caratterizzano il periodo pustolare stesso. In tal modo adunque viene evidentemente chiarita la *patogenesi* de' due processi, le lesioni anatomiche, dei quali trovano la ragione sufficiente di essere nella vita endocellulare del *Citoryctes vaccinae* e rispettivamente del *Citoryctes variolae*. Reso noto in tal maniera l'origine delle alterazioni anatomiche elementari, per naturale induzione si comprende facilmente l'*etiologia* del processo patologico.

Spiegazione della Tavola.

FIG. 1^a. — Campo microscopico in corrispondenza del corpo mucoso del Malpighi di vaioloso, nel quale si nota l'epitelio in preda alle alterazioni caratteristiche del periodo prepustolare del vaiuolo.

(Koristka $\frac{1}{15}$ Imm. omog. - Ocul. comp. 4. - Lung. tubo 160 mm).

FIG. 2^a. — Innesto sulla cornea di coniglio di linfa vaiolosa. Cellule epiteliali fissate dopo 48 ore dalla inoculazione, che presentano l'epitelio in buona parte traforato da vacuetti chiari con dentro i corpicciuoli parassitici, alcuno dei quali si sorprendono nel periodo della scissione.

(Koristka $\frac{1}{15}$ Imm. omog. - Ocul. comp. 4 - Lung. tubo 160 mm).

FIG. 3^a. — Cornea di coniglio dopo 48 ore dall'innesto del pus vaccinico. Si vedono le cellule epiteliali in massima parte prese dal parassita collocato dentro una escavazione.

(Hartnack obb. 8. Ocul. 3).

FIG. 4^a. — Sezione d'una papula miliarica di una cornea di coniglio inoculato da 4 giorni. Le cellule epiteliali contengono il parassita amebiforme dentro escavazioni vacuolari. In alcuni di essi si vede il nucleo, in altri si sorprendono fasi di scissione.

Koristka $\frac{1}{15}$ Imm. omog. — Ocul. comp. 8. — Lung. tubo 160 m.

FIG. 5^a. — *Citoryctes vaccinae*.

a) Esso è contenuto nel protoplasma di una cellula epiteliale rigonfia ed escavata.

b) Altre forme provviste di vacuoli.

(Koristka $\frac{1}{15}$ Imm. omog. - Ocul. comp. 12. - Lung. tubo 160 m.).

FIG. 6^a. — Cellule epiteliali con *Citoryctes vaccinae* in fase di sporulazione (?).

(Koristka $\frac{1}{15}$ Imm. omog. - Ocul. comp. 12. - Lung. tubo 160 m.).

FIG. 7^a. — Serie di fasi di scissione del *Citoryctes vaccinae* tolte da un medesimo preparato.

(Koristka $\frac{1}{15}$ Imm. omog. - Ocul. comp. 12. - Lung. tubo 160 m.).

Fig. 1.

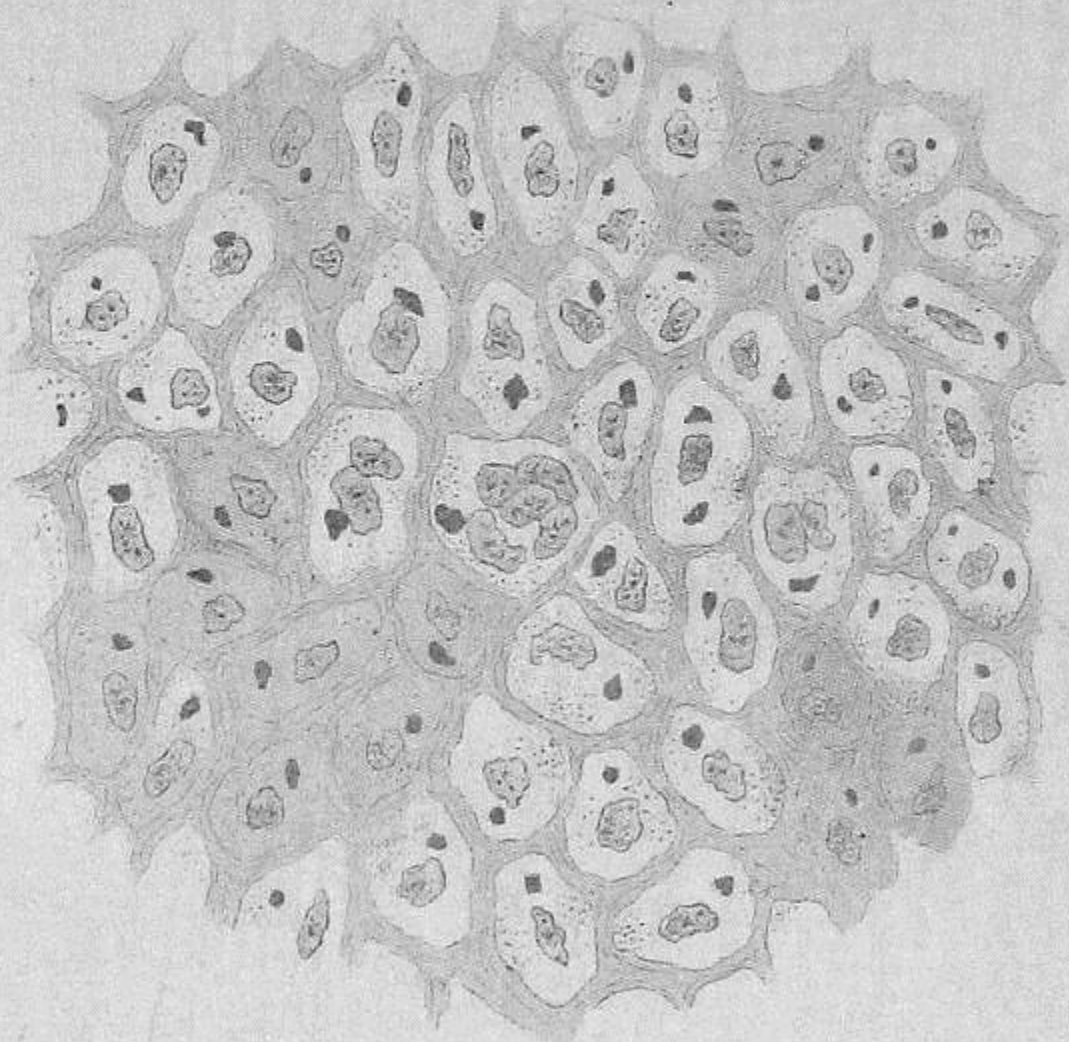


Fig. 3.

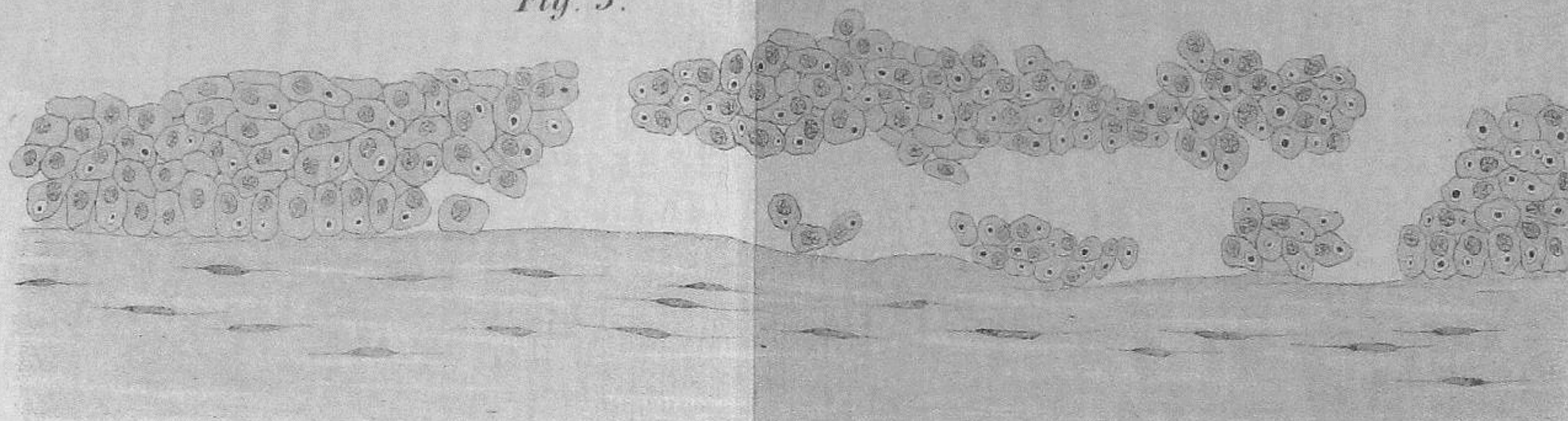


Fig. 4.

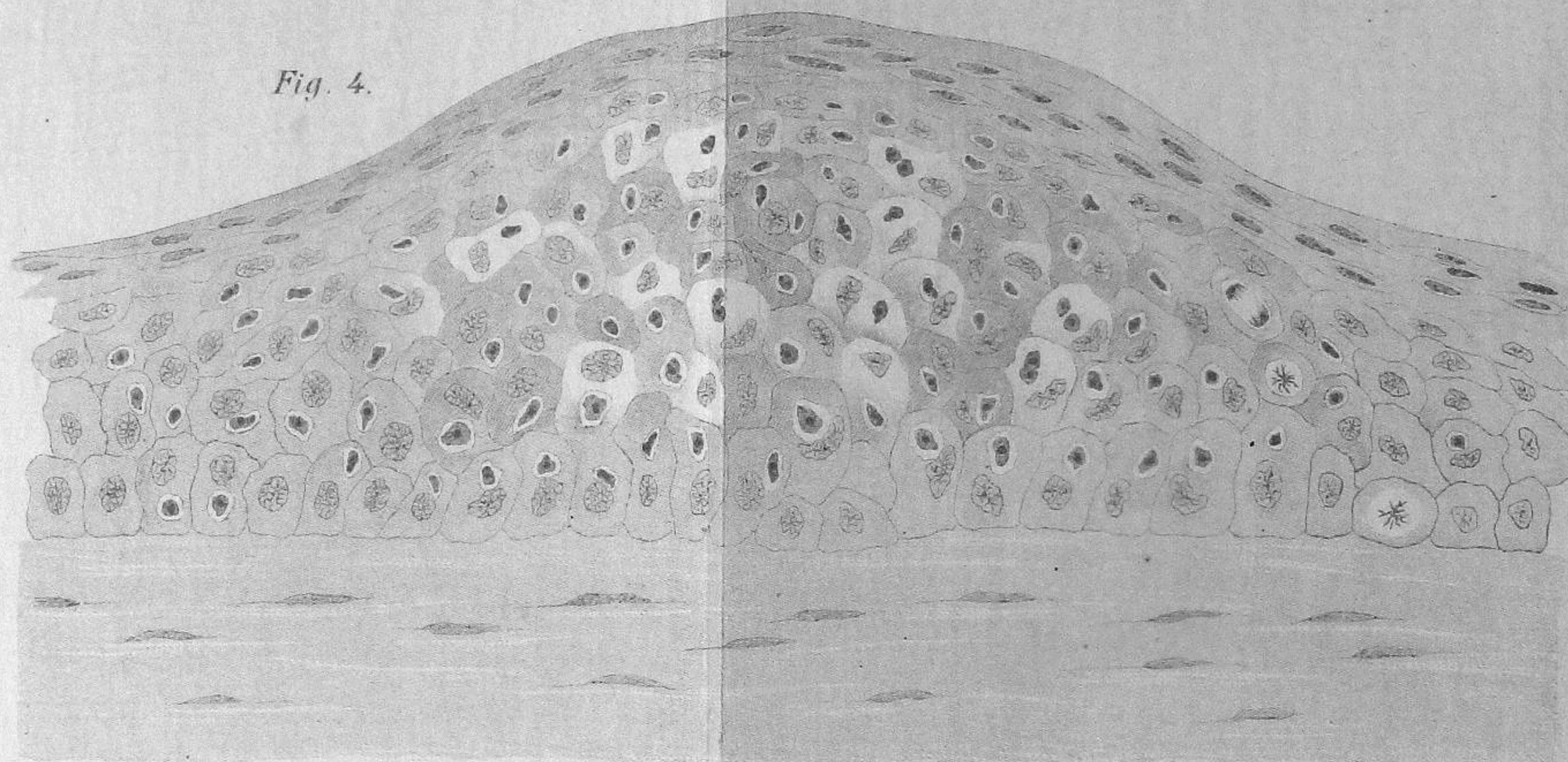


Fig. 2.

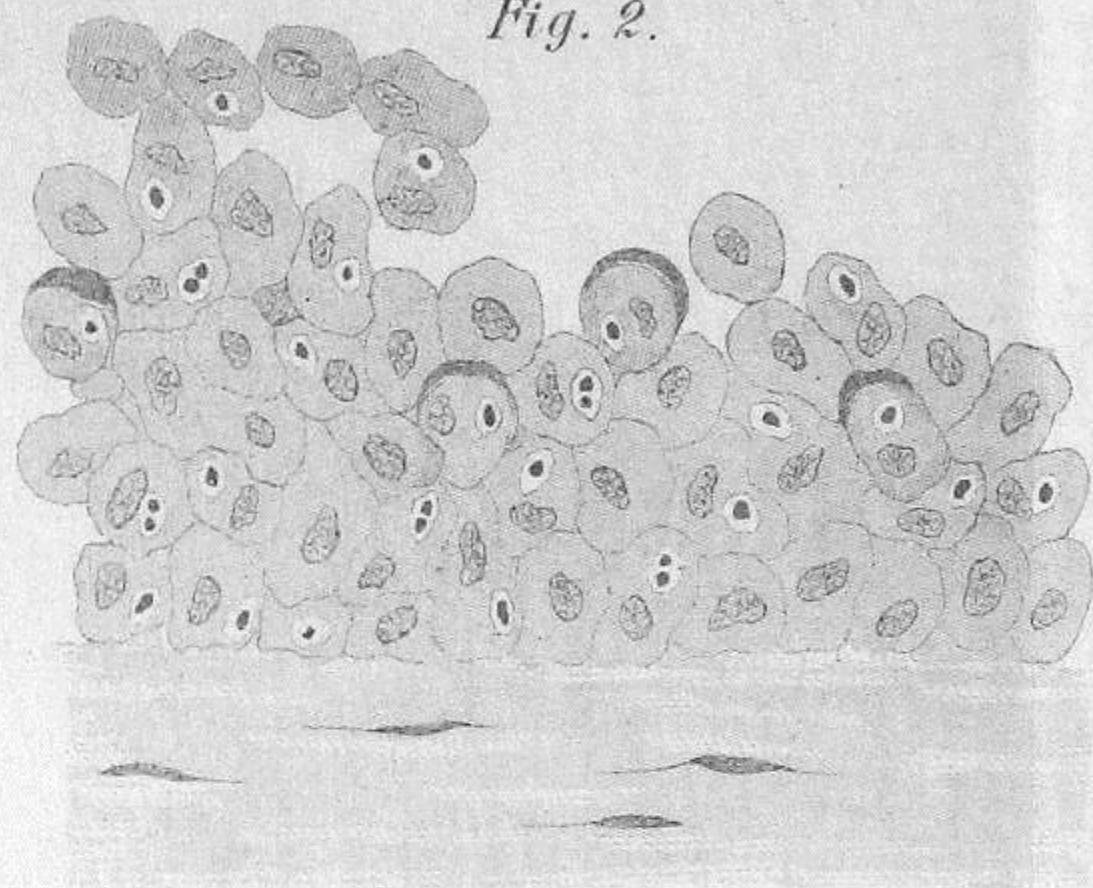


Fig. 5.

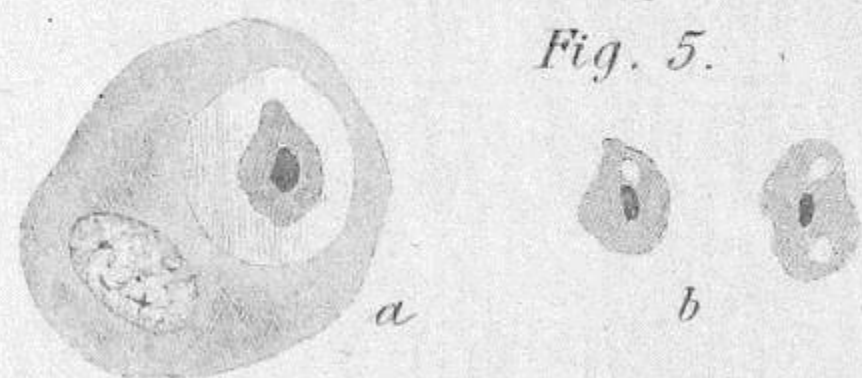


Fig. 6.

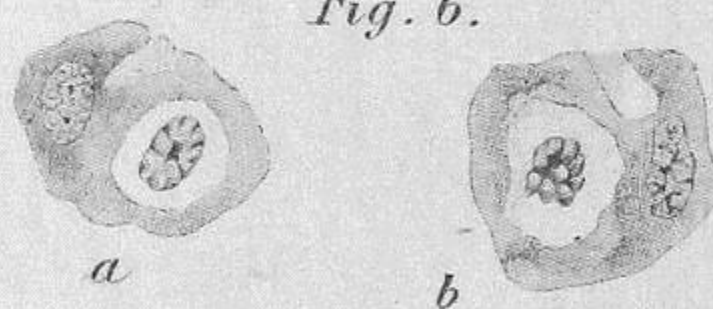


Fig. 7.



